

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09812

研究課題名(和文)再生アソシエイト細胞静注による脳梗塞治療法の開発

研究課題名(英文)A novel culture system enriched in endothelial progenitor cell against ischemic stroke

研究代表者

瀧澤 俊也 (TAKIZAWA, Shunya)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70197234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳梗塞患者を対象とし再生アソシエイト細胞(RACs)静注治療を実現することである。3年間で以下の結果を得た：マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおけるRACs静注の梗塞巣縮小・血管再生・抗炎症効果が確認でき、RACs移植は、脳梗塞患者の血管内皮前駆細胞の分化増幅、血管再生、抗炎症効果をもつ細胞群として“極めて良好な血管再生環境”を生み出すことが確認された。これらの結果を受けて第1相臨床研究の実施を試みたが、現実的なハードルが高くその実現には至らなかった。一方、並行して進めていたMoyamoya病患者の病態解明において、IL-10産生低下がEPC分化を妨げていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は日本人の死因の第4位、要介護を必要とする患者の24%、心筋梗塞の3～10倍の発症率を来す重大な国民病である。我々が開発した再生アソシエイト細胞は、神経細胞保護と血管再生・神経細胞再生の両輪の治療効果が期待出来る新規治療と位置づけられる。RACs移植は、1)培養開始後1週間で移植可能となること、2)採血量が少ないこと、3)自己細胞なので免疫拒絶反応の危険が少ないこと、4)培養に際し特別な機器や施設を必要としないなど多くの臨床応用上の利点を有する。本治療法の有用性が確立されれば、従来の脳梗塞急性期の血栓溶解・血行再建治療に併用して加療を行うことができ、この医学的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel cell population, called regeneration-associated cells (RACs). First, RACs were intravenously injected into syngeneic male mice at 1 day after middle cerebral artery occlusion. Infarct volume at day 7 was significantly reduced by transplantation of RACs. Angiogenesis and anti-inflammatory mediators were increased at day 7. Next, we investigated the characteristics of RACs cultured from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with ischemic stroke, and found good conditions of activated anti-inflammatory and angiogenic monocytes/macrophages after RACs-culture. However, we could not try the phase 1 clinical study because of the difficulty in keeping the culture stabilization and cell quality. In our parallel study, we found the expected mechanism of pathogenesis in Moyamoya disease originated from the insufficient production of IL-10 secreting cells from PBMC.

研究分野：神経内科

キーワード：再生治療 サイトカイン 脳梗塞 血管再生 脳保護

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の脳卒中治療の現況

脳卒中は日本人の死因の第4位、寝たきりになる疾患の第1位、心筋梗塞の3~10倍の発症率を来す重大な国民病である。脳梗塞の急性期治療として発症4.5時間以内は血栓溶解療法、8時間以内は血管内治療が適応となるが、実際の臨床現場では脳梗塞全体の10%以下しか加療されていない。すなわち、90%以上の脳梗塞患者さんは、再発予防を目的とした抗血栓薬投与やリハビリテーションに頼らざる終えない。またrt-PA静注療法を施行できても、3ヶ月後の完全自立者(modified Rankin Scale: mRSで0または1)は40%以下に留まっている(Stroke, 2010)。こうした現状を打開すべく、新規の神経保護や血管再生を標的とした根本的な治療法の確立に大きな期待が寄せられている。

(2) 新たな脳梗塞治療標的

新たな脳梗塞の治療標的として、我々は神経細胞の保護・再生とともに栄養血管新生による血行改善が最も重要であると考え、血管内皮前駆細胞(Endothelial Progenitor Cell: EPC)は、本研究分担者である浅原らがヒト末梢血中にその存在を世界で初めて発見したが

(Science, 1997: 図1に示した第1世代)、その後G-CSFでEPCの分化を促進し回収率を効率化したり(第2世代)、量・質の優れた分化能の高いEPCを増化させる培養法(第3世代)などの改善を重ねてきた。最終的に第4世代として、本研究分担者である増田らは、血管再生能に富み良質なEPCとともに抗炎症型マクロファージや制御性T細胞の増加による抗炎症効果・免疫寛容効果を併せ持つ再生アソシエイト細胞移植培養法(Quality and quantity culture for EPC: QQ培養)を開発した(J Am Heart Assoc, 2014)。我々は2014年-2016年の科学研究費基盤Cの研究助成を受け、再生アソシエイト細胞の動注治療が、マウス永久中大脳動脈閉塞モデルでの梗塞巣の縮小効果・血管再生・抗炎症・脳保護作用を示すことを報告した(Takizawa et al, Neurol Med Chir, 2016)。

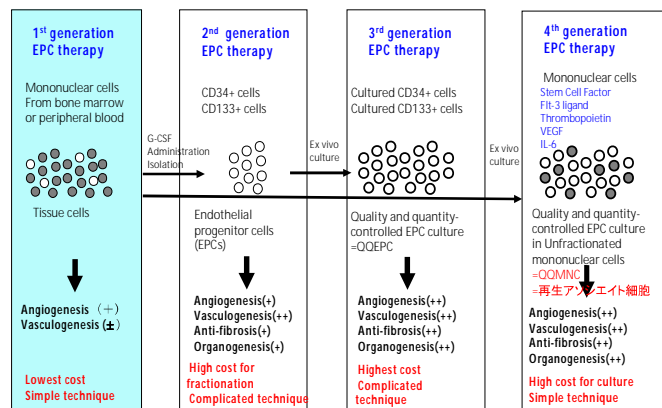
EPCを用いた脳梗塞治療の研究は国内外で行われているが、“良好な血管再生環境”を形成する再生アソシエイト細胞を脳梗塞治療に応用しているのは、国内外で我々だけの独自の研究である。特に、この細胞移植は、培養開始後1週間で移植可能となること、採血量が少ないこと、

自己細胞なので免疫拒絶反応の危険が少ないこと、培養に際し特別な機器や施設を必要としないことなど多くの臨床応用上の利点を有する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、急性期脳梗塞患者を対象として自家血を体外で培養し血管再生・抗炎症・免疫寛容作用を獲得した「再生アソシエイト細胞(Regeneration-associated cells: RACs)」静注治療の臨床応用を実現することである。この目的達成に向けて、マウス中大脳動脈永久閉塞モデルを用い、同種血再生アソシエイト細胞を尾静脈からの投与による脳梗塞巣縮小効果・血管再生・抗炎症効果を評価する。さらに脳梗塞患者および健常人から静脈採血して、QQ培養

図1. EPC培養法開発の経緯



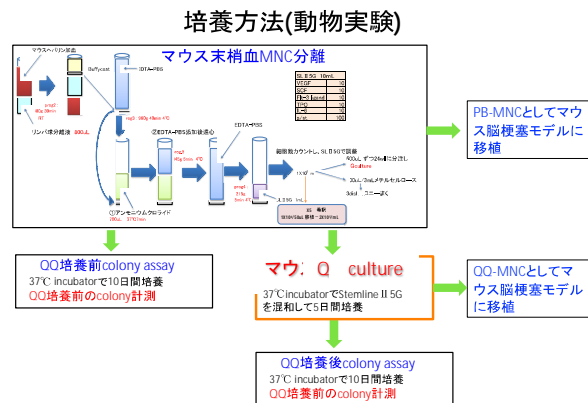
Takizawa, et al, Neurol Med Chir 56:302-9, 2016

(quality and quantity culture for EPC)前後での再生アソシエイト細胞動態解析を行う。上記の結果をもとに、自家血再生アソシエイト細胞移植の臨床応用の実現性を検証し、第1相臨床研究を開始する。

3. 研究の方法

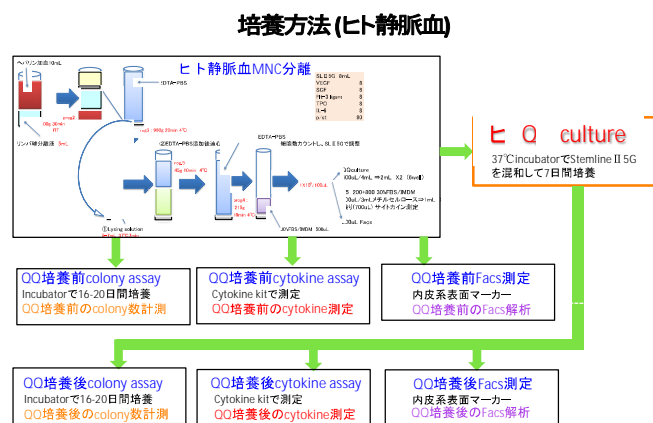
(1) マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおける梗塞巣縮小・血管再生・抗炎症効果

梗塞作成 5 日前に同種 C57BL/6 マウスから静脈血を採取し、末梢血単核球 (PB-MNC) の分離とともに、5 因子 (Stem Cell Factor, Flt-3 ligand, Thrombopoietin, VEGF, IL-6) を加えて 5 日間 Q Q 培養を行う (Masuda et al, J Am Heart Assoc, 2014)。吸入麻酔下で電気凝固による中大脳動脈起始部永久閉塞モデルを作製し、脳梗塞マウス 60 匹を 3 群 (コントロール群、末梢血単核球 (PB-MNC) 投与群、QQ-MNC 投与群) に分ける。虚血 1 日後、3 日後、5 日後に同種アソシエイト細胞を尾静脈から移植する。脳虚血 7 日後に神経症候 (Bederson score、Rotor Rod 試験) を評価し、Carbon black with latex を心注し、脳表血管を撮影後、sacrifice する。マウス脳を 1 mm 間隔で切片にし、4% PFA で固定し、hematoxylin and eosin 染色、ないしは凍結後 Western blot を行う。既報告 (Neurol Med Chir, 2016) に準じて、Rate of infarct volume, Immunohistochemical Staining (IL-10, Iba-1, CD31, VEGF, iNOS, eNOS), Western Blotting (IL-10, Iba-1, CD31, VEGF, iNOS, eNOS), Arteriogenesis を評価する。



(2) 脳梗塞患者静脈血 Q Q 培養での再生アソシエイト細胞の動態解析

脳梗塞患者 50 人および健常人 30 人から静脈採血して、QQ 培養前後での再生アソシエイト細胞動態解析を行う (臨審委第 12R-068 号承認済)。すなわち脳梗塞患者から採取した単核球を培養し、健常コントロールと比較して、EPC 細胞の生育状況、含有している細胞種の差異を検討する。



脳梗塞患者は発症 3 日、7 日、14 日後に静脈採血し、FACS による細胞表面マーカー (CD34, VEGF, CD133, CD14, CD3, CD206, CCR2) のプロファイリング、colony 数を測定し、age-matched 健常者 20 人と比較検討する。また、細胞培養の培養上清を用いてサイトカインアレイ (Ray Bio 社キット) 解析を行い、Q Q 培養前後でサイトカイン (MCP1, IL-8, IL-10, TIMP1, RANTES)、酸化ストレス/内皮マーカー (hCRP, T. chol, TG, HDL, LDL, PAI-1, HbA1c, VEGF, Endostatin) の変動を解析する。また脳梗塞の病型、基礎疾患、MRA や頸動脈エコーなどによる頸動脈や頭蓋内動脈狭窄、脳梗塞病型および重症度と、再生アソシエイト細胞の動態との関連について検討する。

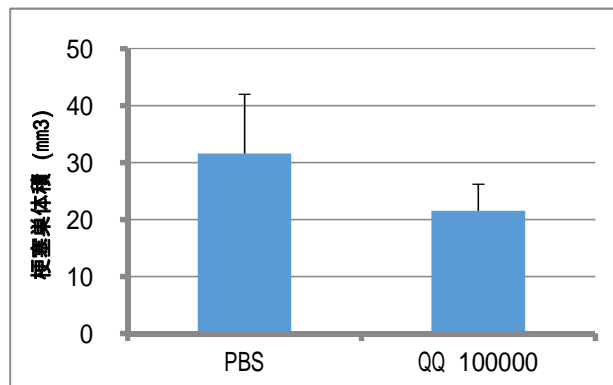
(3)「再生アソシエイト細胞(RACs)静注治療」の臨床応用

脳梗塞発症7日以内に採血した静脈血を7日間培養し、発症14日目にRACsを自家血移植する。移植後/90日後の臨床症状、MRI、SPECT、一般採血、mRSへの影響を評価する。上記の臨床研究実施に向けて東海大学あるいはStemMed社提携の細胞培養センター(CPC)を利用してRACsを製造する。

4. 研究成果

(1) マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおけるRACs静注の梗塞巣縮小・血管再生・抗炎症効果

5日間培養した再生アソシエイト細胞(RACs)を、マウス中大脳動脈閉塞作成24時間後に静注し、移植7日後に神経症候の評価後にsacrificeし、血管再生因子の免疫組織染色、Western blot解析、Matrigelを用いた血管新生能の評価を行った。マウスは3群に分け、PBS投与群(n=12)、単核球細胞(MNC)投与群(n=13)、RAC投与群(n=12)とした。その結果、1)神経症候は3群間で



有意な差を認めなかった。2)PBS投与群と比較し、RAC投与群では有意な梗塞巣の縮小効果を認めた。3)免疫組織染色では、PBS投与群と比較しRAC投与群では、有意なVEGF陽性細胞の増加、IL-10陽性細胞の増加を認めた。しかし、Iba-1, CD31, iNOS, eNOS染色では有意な変化を認めなかった。4)Western blotにおいては、PBS投与群と比較しRAC投与群で有意なVEGFおよびIL-10蛋白発現を確認した。一方、Iba-1, CD31, iNOS, eNOSでは有意差を認めなかった。5)Matrigel tube formation assayでは、MNC群と比較してRAC投与群で血管リング数の有意な増加を認めた。

(2)脳梗塞患者静脈血QQ培養での再生アソシエイト細胞の動態解析

この良質な血管内皮前駆細胞を増やすQQ培養法では、健常者同様に脳梗塞患者(Day 3, Day 10)とともにLarge Cell Colonyを増加させた。健常人と同様にヒト脳梗塞患者Day 3およびDay 10の静脈血においてCD34陽性細胞・CD133・CD206陽性細胞を有意に増加させ、IL-10を増加させた。またサイトカインアレイを用いた検討では、QQ培養法により脳梗塞患者(Day 3, Day 10)とともにTIMP1, CRPが有意に増加し、RANTESは増加傾向を認めた。

(3)「再生アソシエイト細胞(RACs)静注治療」の臨床応用

脳梗塞患者へのRACs静注治療の臨床応用の実現性を検証すべく第1相臨床研究を準備した。しかしながら、前臨床試験の動物実験およびその解析に時間を要したこと、臨床研究申請のための細胞培養手順書の作製中であるが、培養の安定化、細胞品質基準の策定などに時間を要したこと、東海大学のCPC利用を検討しているが、他のCPC利用予定との事前調整に時間を要したこと、などの理由より2019年度は第1相臨床研究の実現には至らなかった。

(4) Moyamoya病患者の血管内皮前駆細胞(EPC)測定とRACsによる血管新生治療研究

2019年度に第1相臨床研究は実現には至らなかったが、一方で並行して進めていた「Moyamoya病患者のEPC測定とRACsによる血管新生治療研究」において以下の成果を得た。我々はQQ培

養法を用いて、Moyamoya 病患者 23 人および age-matched 健常者 23 人における末梢血 EPC 分化過程のプロファイリングを解析した。その結果、Moyamoya 病患者では健常人と比べ成熟 EPC コロニーが減少していた、Moyamoya 病患者では健常人と比べ、培養細胞分泌の IL-10 レベルが減少していた、Moyamoya 病患者の末梢血単核球細胞群にヒト recombinant IL-10 を負荷すると EPC コロニー分化が改善した。以上より Moyamoya 病の病態には、IL-10 産生低下が EPC 分化を妨げていることが関連していると推察された。この結果は Sci Rep. Nov 14;9(1):16752, 2019. に論文として報告した。

以上 3 年間の研究を総括すると、マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおける RACs 静注の梗塞巣縮小・血管再生・抗炎症効果が確認でき、RACs 移植は、脳梗塞患者の血管内皮前駆細胞の分化増幅を促進し、血管再生効果、抗炎症効果をもつ培養細胞群として、“極めて良好な血管再生環境”を生み出すことが確認された。これらの結果を受けて、第 1 相臨床研究の実施を試みたが、現実的なハードルが高く 2019 年度にはその実現には至らなかった。一方、並行して進めていた Moyamoya 病患者の病態解明において、IL-10 産生低下が EPC 分化を妨げていることを示すことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagata E, Masuda H, Nakayama T, Netsu S, Yuzawa H, Fujii N, Kohara S, Sorimachi T, Osada T, Imazeki R, Matsumae M, Asahara T, Takizawa S.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Insufficient production of IL-10 from M2 macrophages impairs in vitro endothelial progenitor cell differentiation in patients with Moyamoya disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 16752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53114-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa S, Nagata E, Nakayama T, Masuda H, Asahara T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Regeneration-associated cell transplantation contributes to tissue recovery in mice with acute ischemic stroke.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0210198.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0210198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 瀧澤俊也	4. 巻 43
2. 論文標題 脳梗塞の急性期治療 現状と課題	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 20-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 瀧澤俊也、北川泰久	4. 巻 146
2. 論文標題 脳血管障害の病態	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 S7-S9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 心脳血管病のイメージングの最前線
3. 学会等名 第5回日本心血管脳卒中学会学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 脳梗塞に対する再生医療、細胞治療-目前に迫る臨床応用-
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 脳梗塞急性期の細胞治療は可能か？
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 脳梗塞急性期の細胞治療
3. 学会等名 第6回日本心血管脳卒中学会学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞による神経保護・再生療法
3. 学会等名 第10回日本脳血管・認知症学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 脳梗塞急性期の細胞治療は可能か？
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 脳梗塞急性期の細胞治療
3. 学会等名 第6回日本心血管脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞による神経保護・再生療法
3. 学会等名 第10回日本脳血管・認知症学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1) 今関良子、永田栄一郎、増田治史、小原さおり、湯澤公子、藤井奈津子、浅原孝之、瀧澤俊也
2. 発表標題 マウス慢性脳虚血モデルにおける再生アソシエイト細胞静注療法の効果について。
3. 学会等名 第9回日本脳血管・認知症学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤俊也、永田栄一郎、中山平、祢津静花、増田治史、浅原孝之
2. 発表標題 急性期脳梗塞に対する再生アソシエイト細胞による脳保護療法の開発
3. 学会等名 第60回日本脳循環代謝学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀧澤俊也
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞による新規脳梗塞治療法の開発。
3. 学会等名 第4回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀧澤俊也、中山平、永田栄一郎、増田治史、浅原孝之
2. 発表標題 再生アソシエイト細胞による新規脳梗塞治療法の開発
3. 学会等名 第42回日本脳卒中学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 下畑享良, 瀧澤俊也, 阿部康二, 鈴木則宏, 北川一夫, 本望修, 山下俊英, 八木田佳樹, 田中亮太, 田中茂, 山下徹, 大星博明, 吾郷哲朗, 鈴木弘美, 澤田誠, 高橋哲哉, 高橋慎一, 堀江信貴, 卜部貴夫, 猪原匡史</p>	<p>4. 発行年 2018年</p>
<p>2. 出版社 南山堂</p>	<p>5. 総ページ数 354</p>
<p>3. 書名 脳卒中病態学のススメ</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永田 栄一郎 (NAGATA Eiichiro) (00255457)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	浅原 孝之 (ASAHARA Takayuki) (20246200)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	増田 治史 (MASUDA Hruchika) (50278496)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	